

# Modulation of Plant Potassium Channel Activities by Phosphorylation

著者	佐藤 愛子
号	54
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	工博第4302号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/61707">http://hdl.handle.net/10097/61707</a>

	さ　　とう　　あい　　こ
氏　　　　　　　　　名	佐　藤　愛　子
授　与　学　位	博士（工学）
学位授与年月日	平成22年　3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科，専攻の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）バイオ工学専攻
学　位　論　文　題　目	Modulation of Plant Potassium Channel Activities by Phosphorylation（植物 K <sup>+</sup> チャネルの K <sup>+</sup> 透過調節機構に関する研究）
指　導　教　員	東北大学教授　魚住　信之
論　文　審　査　委　員	主査　東北大学教授　魚住　信之　東北大学教授　熊谷　泉 東北大学教授　中山　亨

## 論文內容要旨

## 序章

植物が光合成や蒸散を行う際、葉に存在する気孔の孔辺細胞内にイオンや水が流出入して孔辺細胞の膨圧に変化が生じ、気孔の開閉が起こる。乾燥時には、孔辺細胞を収縮することによって気孔を閉口する。その際、孔辺細胞の細胞膜において、イオンの排出輸送体の活性化と細胞内へのイオン吸収輸送体の機能抑制が起こる。シロイヌナズナ  $K^+$  チャネルである KAT1 は、6 回膜貫通構造を持つ膜電位変化（過分極状態）に依存して細胞内へ  $K^+$  を取り込むチャネルであり、孔辺細胞の細胞膜で機能している。このため、乾燥ストレスによって KAT1 は不活性化することが推定されている。KAT1 の  $K^+$  透過の調節を司る機構として KAT1 の Ser/Thr protein kinase によるリン酸化が考えられる。これまでの知見から KAT1 はソラマメの孔辺細胞に局在する乾燥ストレスに応答する植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)依存性の protein kinase である AAPK/ABR kinase 及び、 $Ca^{2+}$  依存性 protein kinase (CDPK) によってリン酸化されることが示唆されていた。本研究では、KAT1 のリン酸化部位の決定および、リン酸化による  $K^+$  輸送活性調節機構を解明することを目的として研究を行った。孔辺細胞において、 $Ca^{2+}$  非依存性かつ

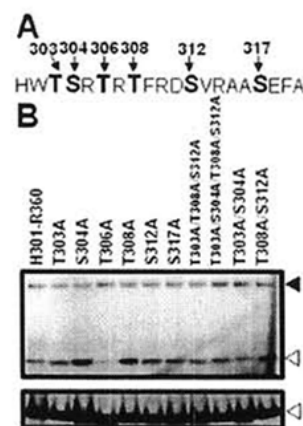


Fig. 1. Thr<sup>306</sup> of KAT1 is a target site of recombinant SnRK2.6 (A) Sequence of the His<sup>301</sup>–Ala<sup>320</sup> region of the KAT1 C-terminus (B)

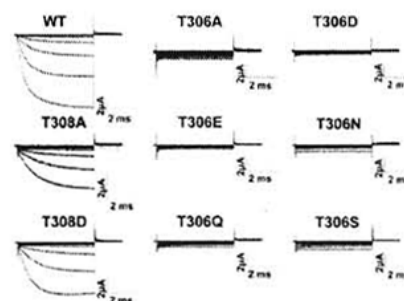


Fig. 2. Mutation of Thr306 impaired the function of KAT1 in *Xenopus oocytes*

ABA 依存性 protein kinase としての機能が広く知られている SnRK2.6 によるリン酸化経路と未知の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 protein kinase によるリン酸化経路の2つの経路に関して、KAT1 のリン酸化部位と  $\text{K}^+$  輸送活性調節機構について解析を行った。また、サイクリックヌクレオチド (cAMP、cGMP) は植物内のさまざまな機能に関与していることが知られているが、KAT1 においてもサイクリックヌクレオチドがチャネル活性を制御することが報告されている。従って、KAT1 の C 末端への結合能および、SnRK2.6 による C 末端のリン酸化へのサイクリックヌクレオチドの影響の検討を行った。

## 第1章 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性、ABA 依存性 protein kinase によるリン酸化と $\text{K}^+$ 輸送活性調節

シロイヌナズナの SnRK2.6 はソラマメの AAPK/ABR kinase のホモログである。SnRK2.6 は気孔の閉口に関与する ABA 依存性の Ser/Thr protein kinase であり、KAT1 と同じ細胞・組織のシロイヌナズナの孔辺細胞と維管束で発現する。SnRK2.6 による KAT1 のリン酸化を確認するため、大腸菌で精製した KAT1 の C 末端領域のペプチドを基質として、大腸菌で発現精製した SnRK2.6 kinase 及びシロイヌナズナ培養細胞の SnRK2.6 過剰発現株より抽出した粗酵素液を用いて、In vitro リン酸化反応およびゲル内 (In gel) リン酸化反応を行い、リン酸化される領域を特定した。さらに、Ser/Thr を Ala にアミノ酸置換した変異ペプチドを作製し、同様に In vitro リン酸化反応を行った (Fig.1)。

また、リン酸化ペプチドを試料として、LC-MS/MS を用いた質量分析を行い、T306 と T308 をリン酸化部位として同定した。次に、リン酸化のチャネル活性への影響を調べるため、KAT1 アミノ酸置換体を作製し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた two-electrode voltage clamp 法により、 $\text{K}^+$  電流の測定を行った。T308A と T308D はいずれも  $\text{K}^+$  輸送活性を有していたが、T306 を A、D、E、N、Q、S に置換した場合はすべて  $\text{K}^+$  輸送活性が消失した (Fig. 2)。また、酵母の  $\text{K}^+$  輸送能欠損株に変異体を発現させ、機能相補試験を行ったところ、T306 はリン酸化状態に模した D 及び E、さらに Q に置換した場合に、 $\text{K}^+$  取り込み能を相補しなかった (Fig. 3)。このことから、T306 は  $\text{K}^+$  透過調節に重要な影響を与えるアミノ酸であり、乾燥時に SnRK2.6 の活性化を通じて KAT1 が不活性化されることが強く示唆された (Fig. 4)。

## 第2章 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 protein kinase によるリン酸化と $\text{K}^+$ 輸送活性調節

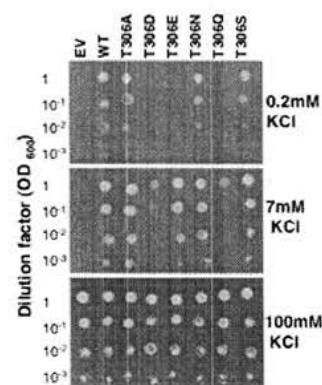


Fig.3. Effect of amino acid substitution of Thr<sup>306</sup> on  $\text{K}^+$ -uptake function in yeast

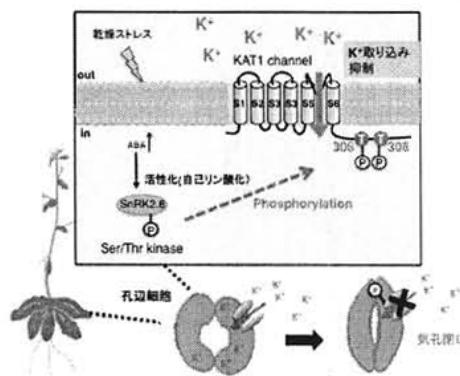


Fig. 4. Regulation of KAT1 channel activity by SnRK2.6

動物細胞では protein kinase C (PKC) がチャネルをリン酸化することによって細胞増殖や細胞伸長に伴うイオン輸送調節を制御することが知られている。一方、シロイヌナズナには PKC のかわりに植物特異的な  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase (CDPK) が多数存在しており、PKC と機能の類似性があることが知られている。さらに、CDPK は PKC と共通の配列を認識してリン酸化する。従って、生体内において PKC の活性化による KAT1 の  $\text{K}^+$ 輸送活性への影響を調べるため、アフリカツメガエル卵母細胞に KAT1 を発現させて卵母細胞内の PKC を活性化させて  $\text{K}^+$ 電流の経時的な測定による解析を行った。細胞透過性の PKC 特異的活性化物質である、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を細胞外液に添加したところ、 $\text{K}^+$ 電流の減少が観察された (Fig. 5)。また、PKC がリン酸化する可能性のある KAT1 の 12 か所の部位を Ala にアミノ酸置換体を作成して、同様に PMA による PKC 活性化測定を行ったところ、6 つの置換体で野生体より  $\text{K}^+$ 電流の減少が小さくなる結果を得た

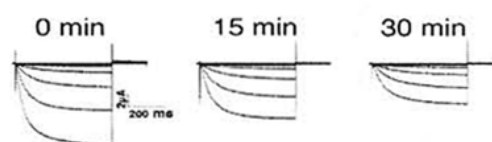


Fig. 5. Effects of PMA on KAT1 WT channel activity

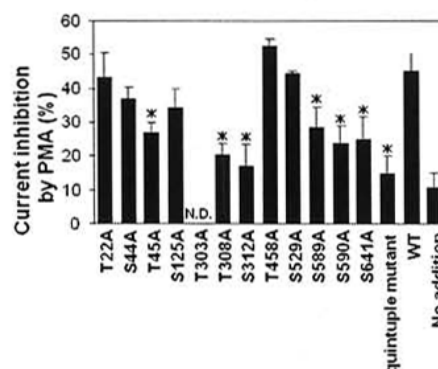


Fig. 6. Effects of mutations on possible phosphorylation sites on KAT1 currents

(Fig. 6)。この結果は 6 アミノ酸がリン酸化されることにより、KAT1 活性が抑制される可能性があることを示している。この結果により、KAT1 は、動物細胞中においては PKC によってリン酸化されることが予測された 6 つの部位が、植物細胞において CDPK によるリン酸化で機能抑制を受けることが考えられ、 $\text{K}^+$ の取り込み抑制に重要な役割を果たす部位であることが推測された (Fig.7)。

### 第3章 サイクリックヌクレオチドの KAT1 の C 末端の結合能及び SnRK2.6 によるリン酸化への影響

KAT1 の C 末領域にはサイクリックヌクレオチド結合が予測される部位があることから、それらにより  $\text{K}^+$ チャネル活性を調節していることが示唆されていた。従って cGMP および cAMP との結合能を検討したところ、KAT1C 末端ペプチドは cGMP と特異的な結合能を示した。しかし、C 末領域を断片化したペプチドとの結合実験から、予測されていたサイクリックヌクレオチド結合部位以外にも cGMP は結合することが明らかになった。一方、cGMP を添加して同時に SnRK2.6 によるリン酸化を検討したところ、リン酸化は阻害された (Fig. 8)。このことから、KAT1

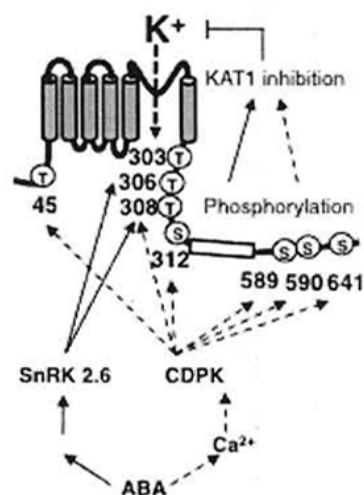


Fig. 7. Possible regulation of KAT1 channel

activity by phosphorylation via

$\text{Ca}^{2+}$ -dependent/independent pathways

の C 末端領域は cGMP 特異的な結合能を持ち、さらに cGMP は KAT1 の C 末端領域のリン酸化を阻害することが示唆された。

#### 第 4 章 総括

本論文によって得られた結果は、植物体において乾燥ストレスをはじめとする環境ストレスによる気孔の閉口の際には、孔辺細胞内の ABA 濃度が上昇に伴ったシグナル伝達により、KAT1 などの孔辺細胞で機能する内向き K<sup>+</sup> チャンネルが複数の protein kinase によってリン酸化されることにより、その K<sup>+</sup> チャンネル活性が阻害され、細胞内への K<sup>+</sup> の取り込みを抑制し、その結果、

細胞の膨圧を低下させる機構が存在することを示唆している。また、Ca<sup>2+</sup> 依存的及び Ca<sup>2+</sup> 非依存的な protein kinase は、それぞれの kinase に特異的な、KAT1 の複数のアミノ酸をリン酸化すると考えられる。さらに、これらのリン酸化反応は、サイクリックヌクレオチドがチャンネルに結合することによって抑制される可能性を示している。本論文における研究により、KAT1 チャンネルは複数のリン酸化酵素によるリン酸化とサイクリックヌクレオチドが関与するシグナル経路による制御機構が存在することが明らかになってきた。近年、SnRK2.6 の標的となるイオン輸送体や、SnRK2 type protein kinase が PP2C phosphatase により活性制御されるメカニズムが、乾燥等のストレス応答に対する植物の持つ ABA シグナリング経路として解明されつつある。生体内における K<sup>+</sup> チャンネルの K<sup>+</sup> 輸送活性調節においても、さらなるリン酸化／脱リン酸化による制御機構の究明が期待される。

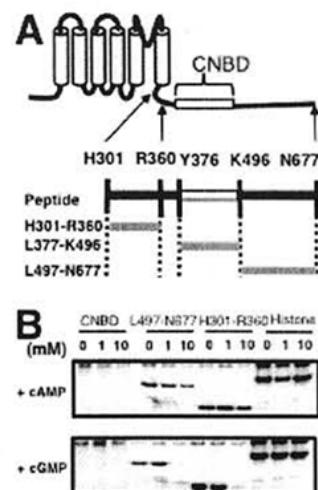


Fig. 8. Inhibition of phosphorylation of KAT1 C-terminal by cGMP (A) Schematic diagram of the examined KAT1 C-terminal peptides (B) In vitro kinase assay of KAT1 C-terminal peptides by SnRK2.6 with and without cyclic nucleotides

# 論文審査結果の要旨

本研究は、シロイヌナズナ K<sup>+</sup>チャネル KAT1 のリン酸化部位の特定およびリン酸化による輸送活性調節機構を明らかにすることを目的として行われた。本論文は植物 K<sup>+</sup>チャネルの K<sup>+</sup>透過調節機構に関する研究と題し、以下の 5 章から構成されている。

序章では、生体における K<sup>+</sup>チャネルによる細胞内への K<sup>+</sup>の取り込み機能の重要性について言及し、シロイヌナズナ K<sup>+</sup>チャネルである KAT1 が Ca<sup>2+</sup>非依存性かつ ABA 依存性 protein kinase および Ca<sup>2+</sup> 依存性 protein kinase (CDPK) によりリン酸化され、輸送活性調節を受ける機構を明らかにすることが、植物の環境ストレス応答におけるシグナル伝達経路を解明する上で重要な知見となることを明示している。

第 1 章では、植物の乾燥ストレスに応答した気孔の閉鎖に関与する Ca<sup>2+</sup>非依存性かつ ABA 依存性 protein kinase である SnRK2.6 が孔辺細胞に発現する K<sup>+</sup>チャネルである KAT1 をリン酸化することを KAT1 C 末端領域のペプチドを用いた In gel および In vitro kinase assay によって確認している。さらに Ser/Thr を 1 アミノ酸置換させたペプチドを用いた In vitro kinase assay とリン酸化ペプチドを用いた質量分析を行うことにより、リン酸化部位の特定に成功している。さらに、特定されたリン酸化部位を 1 アミノ酸置換した変異体を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞発現系と酵母発現系において K<sup>+</sup>輸送活性を測定することにより、特定されたリン酸化部位が KAT1 の K<sup>+</sup>輸送活性に重要な部位であることを明らかにしている。このことは、孔辺細胞において SnRK2.6 によって内向き K<sup>+</sup>チャネルがリン酸化され、細胞内への K<sup>+</sup>取り込みが抑制される機構が、環境ストレスに応答した気孔の閉口時に起こるシグナル伝達経路の一つとして存在することを示唆する新規の知見である。

第 2 章では、KAT1 の Ca<sup>2+</sup> 依存性 protein kinase (CDPK) によるリン酸化部位と K<sup>+</sup>輸送活性調節を明らかにすることを目的としてリン酸化部位の探索と K<sup>+</sup>輸送活性の測定を行っている。アフリカツメガエル卵母細胞発現系において voltage clamp 法により K<sup>+</sup>電流を経時的に測定し、細胞透過性の Protein kinase C (PKC) 活性化物質を細胞外液に添加すると K<sup>+</sup>電流の阻害が起こることから、PKC のリン酸化により KAT1 が K<sup>+</sup>輸送が抑制されることを明らかにしている。さらに、PKC の予測リン酸化部位を 1 アミノ酸置換した変異体を同様に K<sup>+</sup>輸送活性測定を行うことによって、KAT1 が PKC によってリン酸化される部位を特定している。この結果から、植物細胞においては、CDPK によって本章において決定された複数の部位がリン酸化され、K<sup>+</sup>輸送を抑制する機構が存在する可能性を議論しており、CDPK によってリン酸化される可能性のある部位を特定した新規性のある知見である。

第 3 章では、KAT1 の C 末端領域におけるサイクリックヌクレオチドの結合および、第 1 章で明らかとした SnRK2.6 のリン酸化に対するサイクリックヌクレオチドの影響を検証している。KAT1 の C 末端領域ペプチドを用いたサイクリックヌクレオチド結合実験により、cGMP が特異的に結合することを新規に明らかにしている。さらに SnRK2.6 による In vitro kinase assay をサイクリックヌクレオチド存在下で行い、cGMP が特異的にリン酸化反応を阻害することを示し、サイクリックヌクレオチドの結合も K<sup>+</sup>輸送活性調節に関与することを示唆している。

第 4 章は、本論文の総括である。

以上要するに本論文は、シロイヌナズナ K<sup>+</sup>チャネル KAT1 において Ca<sup>2+</sup>非依存性かつ ABA 依存性 protein kinase および Ca<sup>2+</sup> 依存性 protein kinase (CDPK) それぞれの標的となるリン酸化部位を同定し、同定された複数の部位においてリン酸化することによって K<sup>+</sup>取り込みの抑制が起こることを明らかにした。本論文において得られた知見は、植物において、乾燥をはじめとする環境ストレスが起こったと

きに孔辺細胞内の ABA 濃度が上昇に伴ったシグナル伝達により、KAT1 などの孔辺細胞で機能する内向き K<sup>+</sup>チャネルが複数の protein kinase によってリン酸化されることによって、その K<sup>+</sup>チャネル活性が阻害され、細胞内への K<sup>+</sup>の取り込みを抑制し、その結果、細胞の膨圧を低下させる機構が存在することを示唆している。本論文において得られた新規の知見は、植物におけるストレス耐性機構の解明と機能向上に向けた科学技術の進歩に貢献するものである。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。